



РЕЦЕНЗИЯ

от акад. проф. Иван Георгиев Иванов, дбн
на дисертационния труд на Елина Александрова Александрова „Генетични и клетъчни фактори на имунната система при колоректален карцином“, представен за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ в Област на висшето образование 4. „Природни науки, математика и информатика“, Професионално направление 4.3. Биологически науки. Докторска програма: „Биохимия“

1. Обща част

Елина Александрова Александрова разработва докторската си дисертация по научна специалност „Биохимия“, като редовен докторант в Катедра „Медицинска химия и биохимия“ при Медицинския факултет на ТрУ-Стара Загора под научното ръководство на проф. д-р Татяна Влайкова и проф. д-р Мая Гълъбова. Нейният дисертационен труд обхваща 123 стандартни страници, онагледен е с 16 таблици и 48 фигури (включително микрофотографии) и включва 276 литературни източници. Той е апробиран и одобрен за защита от разширен катедрен съвет на обучаващата катедра. Прегледът на документацията представена във връзка със защитата показва, че процедурата по зачисляване в докторантура, обучение и отчисляване е спазена и документите съпътстващи дисертацията са изготвени съгласно изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение.

2. Кратки биографични данни

Елина Александрова е възпитаник на Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, който завършва през 2006 г. с ОКС „Бакалавър“ по специалността „Молекулярна биология“, а през 2009 г. и ОКС „Магистър“ по „Медицинска химия“. От 2014 г. до 2017 г. е редовен докторант в Катедра „Медицинска химия и биохимия“ при ТрУ - Ст. Загора. Тя е автор на 14 научни статии, от които 7 в реферирани списания с ИФ, 3 в реферирани списания без ИФ и 4 в сборници от научни форуми. Докторантката е участвала и в разработването на 12 научно-изследователски проекти. Тя е носител на наградата на ТрУ-Ст. Загора за 2018 г. за активна публикационна дейност.

3. Актуалност на разработваната тема

Дисертационният труд на Елина Александрова е посветен на изясняването на генетичните основи и клетъчно-молекулните механизми на процесите водещи до появата и прогресията на колоректален карцином (КРК). Неговата честота на заболяемост е значителна и заема водещо място като причина за смъртта и при двата пола. Геномните изследвания от последните 1-2 десетилетия все по убедително доказват, че КРК има наследствена предиспозиция.

Имайки предвид голямата социална значимост на КРК и значението на молекулярно-генетичните изследвания за изясняването на неговата етиология, диагноза и прогноза, актуалността на разработваната тема не подлежи на дискусия.

4. Познаване на проблема

Докторантката е добре запозната с литературата по разработваната тема. Литературният обзор обхваща 30 страници и се основава на повече от 200 съвременни литературни източници. След уводната част, където Е. Александрова представя епидемиологията и особеностите на колоректалния карцином, в следващите раздели на обзора тя разглежда задълбочено молекулните основи на неговата патогенеза, ролята на дендритните клетки в изграждането на противотуморния имунитет, двойствената роля на TGF- β 1 в канцерогенезата, модулиращата роля на интерлевкин 12 (IL-12) при осъществяването на диалога между клетките в туморната среда, ролята на IL-10 в противотуморния имунитет, както и ролята на цитокините IL-17A и IL-17F в патогенезата

на КРК. Литературното проучване показва, че водещи фактори за възникването и прогресията на КРК са поддържането на хроничен възпалителен процес в червата, съставът на възпалителната среда и не на последно място - генетичната предиспозиция. Литературните данни сочат също, че дендритните клетки (ДК) образуват първата линия на защита при създаването на противотуморен имунитет, а балансът между зрелите и незрелите ДК определя имунния отговор и прогнозата за заболяването.

Литературният обзор впечатлява със задълбочения и творчески анализ на обемистата литература, а направените изводи са резюмирани в заключението към обзора. Въз основа на тях докторантката открива изследователската си ниша и формулира целта на своята дисертация, а именно, *да изясни ролята на определени полиморфизми в гените на ключови цитокини в развитието и прогресията на КРК*. За целта тя си поставя за задача да изследва връзката между генотипа и инфилтрацията на туморната тъкан с различни типове дендритни клетки сред български пациенти, като за целта формулира 6 конкретни задачи.

5. Методика на изследването

Експерименталните изследвания са проведени с използването на разнообразна методология и съвременна техника. Методите биват биохимични, молекулярно-генетични, клетъчно-биологични, имунологични, статистически и др. Те са описани под формата на подробни протоколи, което позволява възпроизвеждането им без необходимост от допълнителна литература. Това придава на дисертацията характер на методично пособие за студенти, докторанти и специализанти в областта на медицинската биохимия и молекулярна генетика. Овладейвайки описаните методи докторантката е постигнала една от основните цели на докторантурата – придобиване на експериментални знания и умения и способност за самостоятелно провеждане на комплексни лабораторни изследвания.

6. Оценка на получените резултати

Резултатите от изследванията на Е. Александрова са представени на 36 страници и са илюстрирани с 40 фигури и 13 таблици. В изследването са включени 256 пациенти с КРК (138 мъже и 118 жени на възраст между 22 и 88 години) и 292 здрави индивиди. При пациентската група ДНК е изолирана от оперативен материал, а при контролната - от кръв. ДНК е използвана за генотипиране на ендонуклеотидни полиморфизми (SNPs) в предварително избрани гени. Въз основа на литературни данни са определени и самите полиморфизми като вероятно асоциирани с КРК, а именно: TGFB1 -509C/T, IL10 -1082A/G, IL12Vpro, IL17A -197A/G и IL17F 7488T/C. Чрез анализ на експресията на имунохистохимичните маркери S100, CD1a, CD11c, CD123 и CD83 са изследвани субкласовете дендритни клетки инфилтриращи туморната тъкан и инвазивния туморен фронт при пациенти, които вече са генотипирани по отношение на полиморфизмите TGFB1, IL10 и IL12Vpro. Определена е и транскрипцията (на ниво иРНК) на гените TGFB1 и IL17A в туморна и здрава лигавична тъкан с цел да се потърси връзка между генната експресия и клиничната картина на пациентите с КРК.

Резултатите от изследванията показват, че носителството на Т-алела в полиморфизма TGFB1 -509 C/T е асоциирано с привличането на незрели дендритни клетки в туморното микроокръжение и е важен фактор свързан с тяхното съзряване. За полиморфизма IL10-1080 A/G докторантката установява, че той не представлява рисков фактор в патогенезата на КРК, но нископродуциращият А-алел е асоцииран с по-лоша прогноза за заболяването. Промоторният полиморфизъм IL17A-197 G/A пък е свързан с риска от развитие на КРК, като хетерозиготният генотип А/G би могъл да има и протективно значение. За разлика от него вискоекспресиращият се А-алел се разглежда като неблагоприятен фактор в прогресията на КРК. Не са така дефинитивни заключенията по отношение на А-алела IL10 (-1080 A/G), който може да се разглежда като генетичен фактор свързан със съзряването на дендритните клетки, а също на IL12Vpro полиморфизма, който е

неутрален по отношение на предразположението към КРК. Ниско продуциращият I/I-генотип при IL12Bpro не повлиява навлизането на дендритни клетки в туморната тъкан, но може да модулира процеса на тяхното съзряване. Изводът относно полиморфизма IL17F -7488 T/C е, че той не представлява съществен фактор свързан с предиспозицията към КРК. Интересно е наблюдението, че активността на гените TGFB1 и IL17A е по-ниска в туморната тъкан в сравнение със здравата контролна лигавица при пациенти с КРК, като тя е по-ниска при по-младите пациенти. Докторантката доказва също, че пациентите с по-ниска инфилтрация със зрели тумор-инфилтриращи дендритни клетки имат по-ниска преживяемост и по-лоша прогноза за изхода от заболяването спрямо тези с висока инфилтрация.

Експериментални резултати са дискутирани творчески в светлината на литературните данни в раздел „Обсъждане“. Тук при интерпретацията на геномните данни докторантката е взела под внимание и клиничната картина на пациентите, което е довело до намирането на интересни генотип-фенотипни корелации отнасящи се до възникването и прогресията на КРК. Това още веднъж затвърждава впечатлението ми, че тя умее да работи творчески с научната литература.

7. Приноси и научна значимост на разработката

Изследванията свързани с дисертацията на Елина Александрова имат подчертан научно-приложен характер. Тя провежда за първи път молекулярно-генетичен анализ на голям брой български пациенти с КРК, търсейки връзка на подбрани полиморфизми с неговата етиология и прогресия. Пионерни (в световен мащаб) са изследванията ѝ относно ролята на генотиповете TGFB1 -509C/T, IL10 -1080 A/G и IL12Bpro в съзряването на популациите дендритни клетки в туморната строма и туморната граница. Оригинална е и предложената хипотеза за супресорното действие на цитокините TGF- β 1, IL-10 и IL-12 върху съзряването на дендритните клетки в туморното гнездо. Като съществен принос трябва да отбележа и доказването на протективната роля на хетерозиготното носителство на IL17A -197G/A полиморфизма и неблагоприятния ефект на А-алела върху прогресията на КРК. Съществено е и доказването на протективната роля на Т-алела на TGFB1 -509C/T полиморфизма за развитие на КРК и едновременно с това неблагоприятната му роля в прогресията на заболяването. Като свързани с прогресията на КРК Александрова определя и полиморфизмите IL12Bpro (rs17860508), IL10 -1082 A/G (rs1800896) и IL17F 7488 C/T (rs763780).

8. Публикации свързани с дисертацията

Във връзка с дисертационния труд са публикувани 3 статии в списания с ИФ (общ ИФ 5.151), в една от които докторантката е водещ автор. Резултатите от дисертацията са докладвани и на 6 научни форуми, от които 2 национални (където докторантката е водещ автор) и 4 в чужбина.

9. Автореферат, изводи приноси

Запознат съм с проекта за автореферат и намирам, че той отразява адекватно съдържанието и постиженията на дисертацията. Направените изводи и приноси са обективни и съответстват на получените резултати.

10. Критични бележки и въпроси

Във връзка с проекта за дисертация представен за апробация имах някои въпроси и препоръки от техническо естество, които установявам, че са взети предвид при окончателното оформяне на дисертационния труд.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Десертационният труд на Е. Александрова е посветена на изясняването на генетичната предиспозиция към КРК чрез изследване на подобрани полиморфизми в гени асоциирани с него. Паралелно с това докторантката изследва и разпространението на тези полиморфизми в българската популация, което се извършва за първи път у нас. Изследванията представляват интерес както за фундаменталната онкогенетика, така и за диагностиката на КРК и прогнозата за неговото протичане. За постигане на своите цели докторантката е провела значителни по обем експериментални изследвания прилагайки модерна методология, а получените резултати са отразени в 3 научни статии в списания с ИФ. В една от тях тя е водещ автор. Резултатите са докладвани и на 6 научни форуми. Със своя дисертационен труд Е. Александрова се представя като добре подготвен специалист в областта на медицинската биохимия и молекулярна биология. Считаю, че по научни резултати и професионална квалификация тя удовлетворява напълно изискванията на ЗРАСРБ и на вътрешните правилници на ТрУ-Стара Загора за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“ по докторантска програма „Биохимия“, което ми дава основание да препоръчам на уважаемото научно жури да ѝ я присъди.

12.08.2019 г.

Рецензент:


/Акад. Иван Г. Иванов/

PhD Thesis Review

From **prof. Ivan Georgiev Ivanov, DSc**

Concerning the dissertation of **Elina Aleksandrova Aleksandrova** named “**Genetic and cellular factors of the immune system in colorectal cancer**”, presented for acquiring a **PhD** scientific degree in doctoral program “**Biochemistry**”, Professional Degree 4.3. "Biological Sciences" Higher Education Area 4. "Natural Sciences.

1. General notes

Elina Aleksandrova Aleksandrova completes her dissertation as a full-time PhD student at the Department of Medical Chemistry and Biochemistry of the Medical Faculty in Trakia University-Stara Zagora under the scientific supervision of prof. Tatyana Vlaykova, PhD and prof. Maya Gulubova, MD, PhD. The PhD thesis comprises 123 standard typewriting pages, it is illustrated with 16 tables and 48 figures (including microscopic images) and includes 276 cited references. The thesis has been discussed and approved on a scientific meeting of the educating department. The review of the documentation submitted in relation to the defense shows that the procedure for enrollment, training and expulsion has been complied with and the documents accompanying the dissertation have been prepared in accordance with the requirements of the ZRASRB and the Rules for its implementation.

2. Short biographical notes

Elina Aleksandrova has received a Bachelor's degree in Molecular biology at The Faculty of Biology of Sofia University in 2006 and consequently has acquired a Master's degree in Medical Chemistry in 2009. She has been enrolled as a full-time PhD student in the period of 2014-2017 at the Department of Medical Chemistry and Biochemistry of the Medical Faculty in Trakia University-Stara Zagora. She is an author of 14 scientific publications 7 of which published in impact factor (IF) refereed journals, 3 in journals with no IF and 4 in abstract books of scientific meetings. The PhD student has worked on 12 research projects. In 2018 she has been a recipient of an Active Publication Award of Trakia University.

3. Topicality of the thesis research

The PhD thesis research of Elina Aleksandrova is focused on elucidating the genetic basis and cellular-molecular processes underlying the development and progression of colorectal cancer (CRC). The disease has significantly high rates of incidence and it is the second leading cause for death in both genders. Genome-wide studies from the last 1-2 decades have proved that CRC can be genetically predisposed.

Given the social significance of CRC and the importance of the molecular genetics research on its etiology, diagnosis and prognosis the topicality of the current dissertation is undisputable.

4. Knowledge of the topic

The PhD student is well aware with the scientific literature regarding the thesis topic. The literature review comprises 30 pages based on more than 200 contemporary literary sources. After the introduction part in which the epidemiology and characteristics of CRC are outlined, detailed overview of the molecular basis of CRC development, the role of dendritic cells in the tumor immunity, the dual role of TGF- β 1 in tumor genesis, the modulating role of IL-12 in the dialog between the cells in the tumor microenvironment, the role of IL-10 in the tumor immunity and the role of IL-17A and IL-17F in CRC pathogenesis is presented in the consequent chapters. The review shows that chronic inflammation, the inflammatory microenvironment and genetic predisposition are leading factors in CRC incidence and progression. Also, according to the scientific data dendritic cells are the first line of defense in antitumor immunity and the balance between mature and immature DC defines the immune response and is predictive for the prognosis of CRC.

The Literature Review impresses with the deep and creative analysis of the voluminous literature and the conclusions drawn are summarized in a separate part. On the basis of that the student discovers her research niche and formulates the purpose of the thesis, namely elucidating the role of certain polymorphisms in cytokine genes involved in the development and progression of CRC. To achieve her aim she formulates 6 specific tasks in order to study the association between the genotypes and the infiltration of the tumor tissue with different populations of DCs among patients from the Bulgarian population.

5. Evaluation of the methods

The experiments have been conceived via contemporary and diverse methods and instruments. The methods applied are biochemical, molecular-genetics, cellular, immunological, statistical, etc. these are described in details as protocols which makes them perfectly suitable for application by independent users without the need of additional literature. This makes the dissertation resemble a protocol book suitable for undergraduate or PhD students working in the field of Medical biochemistry and Molecular biology. Working with these methods the student has acquired the main purpose of a PhD program- acquiring experimental knowledge and technique and ability conceiving independent and complex laboratory research.

6. Evaluation of the results

The results are described in 36 pages and illustrated with 40 figures and 13 tables. The current study enrolls 256 CRC cases (138 female and 118 male patients with age range of 22 to 88 years) and 292 control individuals. DNA from the patients was extracted from biopsy tissue specimens and DNA from the controls was extracted from blood. The extracted DNA has been used for genotyping of selected single nucleotide gene polymorphisms (SNPs). On the basis of the literature review five SNPs have been selected as candidates involved in the predisposition of CRC, namely *TGFB1* -509C/T, *IL10* -1082A/G, *IL12Bpro*, *IL17A*-197A /G and *L17F* 7488T/C. The subpopulations of DCs infiltrating the tumor stroma and in the invasive tumor border in patients genotyped for *TGFB1* -509C/T, *IL10* -1082A/G, *IL12Bpro* SNPs have been studied via the immunohistochemical markers CD1a, CD11c, CD83, CD123 and S100. Relative gene expression of *TGFB1* and *IL17A* mRNAs in tumor and non-tumor

tissue was studied in relation to clinical data of the patients. The results demonstrate that the T-allele of the *TGFBI* -509C/T polymorphism is associated with the recruitment of immature DCs in the tumor tissue and might be a factor involved in their maturation. For the *IL10* -1082A/G promoter SNP no association with CRC predisposition has been observed but the low-producing allele might determine a worse prognosis for the disease. The *IL17A* -197 A/G promoter polymorphism has been determined as a genetic factor in CRC predisposition as the heterozygous A/G genotype might have a protective role in the pathogenesis of the disease. On the contrary the A-allele is described as an unfavorable genetic factor in CRC predisposition. Not so conclusive remain the observations concerning the A-allele of the *IL10* -1082A/G which could be a genetic factor involved in DCs maturation and the *IL12Bpro* polymorphism was not associated to CRC risk as well. The low-producing 1/1-genotype though might modulate the maturation process of DCs recruited to the tumor microenvironment. The conclusion regarding the *IL17F* -7488T/C SNP states that this genetic variation is not a risk factor in CRC incidence. An interesting observation is reported that the *TGFBI* and *IL17A* mRNA levels are lower in the tumor tissue of CRC patients compared to the adjacent non-tumor tissue, especially in younger patients. The PhD student also proves that the patients with lower DCs infiltration in the tumor tissue have shorter median survival and worse prognosis than those with higher DCs infiltration.

The results are creatively discussed in the Discussion chapter. In the interpretation of the genome data the student has taken into consideration the clinical parameters of the patients which has drawn interesting genome-phenotype correlations regarding the development and progression of CRC. That is another reason for my opinion that the PhD student is very capable of interpreting scientific literature.

7. Contribution of the thesis

The research in the current PhD Thesis has a strong scientifically applied character. This is the first molecular-genetics analysis on a wide group of Bulgarian patients focused on the involvement of certain polymorphisms and CRC's etiology and progression. Pioneer are the experiments about the role of *TGFBI*, *IL12Bpro* and *IL10* SNPs in the maturation of DCs the tumor microenvironment. Also, original is the proposed hypothesis on the suppressing role of TGF- β 1, IL-10 and IL-12 in the maturation of DCs. As a significant contribution of the thesis the protective role of the heterozygous genotype for the *IL17A* -197A/G SNP must be noted. The proved protective role of the T-allele of the *TGFBI* -509C/T SNP and simultaneously its negative effect on the progression of the disease also deserves attention as a significant contribution of the current study. The three polymorphisms *IL10* -1082A/G, *IL12Bpro*, *IL17F* 7488T/C are outlined as factors associated with the progression of the disease.

8. Evaluation of the publication activity

Three full-text scientific papers in refereed journals with impact factor (IF) have been published (IF=5.151) in relation to the thesis's topic in one of which the student is the leading author. The results have been presented in 6 scientific forums two of which at national level (the student is the leading author) and 4 in meetings abroad.

9. Evaluation of the abstract, conclusions and the contributions

I have been aware with the abstract's project which I find adequate to the content and the contributions of the thesis. The conclusions and contributions drawn are objective and reflect the results obtained.

10. Critical notes and questions

I have had some technical questions and recommendations in relation to the project of the submitted dissertation and I find that these issues are taken into account in the final design of the dissertation.

CONCLUSION

The dissertation of Elina Aleksandrova is dedicated to elucidating the genetic predisposition to CRC via genotyping of selected polymorphisms in genes associated with the disease. In parallel, the student examines the distributions of the genotypes among the Bulgarian population which is the first study of this kind in Bulgaria. This study is of great interest both for the fundamental oncogenetics and for the diagnostic and prognosis of CRC. To achieve her aims the student has conducted a large group of experimental studies and the results obtained have been published in three full-text scientific publications in journals with impact factor. In one of the publications the student is the leading author. The results have also been reported to 6 scientific forums. With this thesis Elina Aleksandrova presents herself as a well prepared specialist in the fields of medical biochemistry and molecular biology. I consider that the with the scientific results and professional qualification she fully meets the criteria of the ZRASRB and the Rules for its implementation in Trakia University for obtaining a doctoral degree in Biochemistry, which gives me the a reason to recommend the honorable jury to award Elina with the degree.

12.08.2019

Reviewer: